Aus dem Anatomischen Institut der Universität Düsseldorf,
Lehrstuhl II
Direktor: Professor Dr. med. Hans Günther Goslar

und dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentielle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

Morphometrische Untersuchungen zur Bestimmung der Ausdehnung und der Kinetik des intertubulären fetalen Leydigzellsystems der Ratte mit Hilfe des Enzyms Steroid-3ß-Ol-Dehydrogenase

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans-Georg Ziegler

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543915_0018

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Düsseldorf,
Lehrstuhl II
Direktor: Professor Dr. med. Hans Günther Goslar

und dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene
an der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. med. Hans-Werner Schlipköter

Abteilung für Experimentielle Pathologie
Leiter: Professor Dr. med. Werner Hilscher

Morphometrische Untersuchungen zur Bestimmung der Ausdehnung und der Kinetik des intertubulären fetalen Leydigzellsystems der Ratte mit Hilfe des Enzyms Steroid-3ß-Ol-Dehydrogenase

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Hans-Georg Ziegler

1983

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.:
Prof. Dr. med. H. Th. Brüster

Referent
gez.:
Prof. Dr. med. H.G. Goslar

Korreferent
gez.:
Prof. Dr. med. W. Hilscher

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung S. 1

II. Material und Methodik S. 5

I. Versuchstiere S. 5

II. Fixierung der Schnitte S. 7

III. Enzymhistochemische Reaktion S. 9

IV. Morphometrische Auswertung S. 10

III. Ergebnisse S. 12

IV. Diskussion S. 22

V. Zusammenfassung S. 35

VI. Literatur S. 38

VII. Mein Lebenslauf S. 44

VIII. Danksagungen S. 46

I. Einleitung

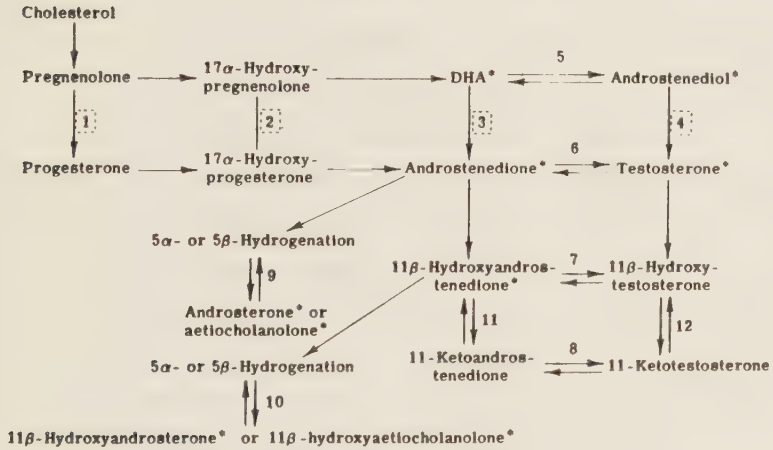
Nach Befunden von van Straaten (1978), die beim Schwein erhoben wurden, kann bei dieser Spezies zwischen einem intertubulären und einem peritubulären Leydigzellsystem unterschieden werden. Untersuchungen am Rattentestis von Roosen-Runge und Anderson (1959), Niemi und Ikonen (1963) sowie Lording und de Kretser (1972) ergaben übereinstimmend zwei Entwicklungsphasen des Leydigzellsystems, und Lording und de Kretser (1972) nehmen das Vorhandensein von zwei getrennten Leydigzellgenerationen an.

Detaillierte enzymhistochemische Untersuchungen des Leydigzellsystems der Ratte (Passia et al. 1978) ergaben, daß auch bei dieser Spezies zwischen einem intertubulären und einem peritubulären Leydigzellsystem unterschieden werden kann. Dabei entspricht das intertubuläre System weitgehend - wenn nicht ausschließlich - dem fetalen Leydigzellsystem und das peritubuläre analog dem Leydigzellsystem des adulten Tieres.

Andere Untersuchungen (Passia et al., 1978, Quante et al., 1978 sowie Goslar et al., 1980) ergaben zeitliche Zusammenhänge zwischen den beiden Leydigzellsystemen und der Kinetik der Geschlechts- und Stützzellen. Ungefähr um den 15. Fetaltag treten die Vorläufer des fetalen Leydigzellsystems auf. Am 17. Fetaltag wird das intertubuläre Leydigzellsystem aktiv. Zur gleichen Zeit entstehen durch Teilung der letzten Generation der M-Prospermatogonien, die ein Proliferationssystem darstellen, die T_1-Prospermatogonien. Sie teilen sich um den 5. Tag post natum mitotisch und leiten damit einen neuen Proliferationsschub ein, der schließlich zum Aufbau des endgültigen Samenepithels führt (Hilscher und Hilscher 1976). Der in der vorliegenden Arbeit gewählte Beobachtungszeitraum des intertubulären fetalen Leydigzellsystems der Ratte entspricht somit jener Entwicklungsphase des Testis, in der die T_1-Prospermatogonien das Gros der Geschlechtszellen bilden.

Zum Nachweis der Aktivität des Leydigzellsystems wurde als "Schlüsselenzym" die Steroid-3ß-ol-

Dehydrogenase (St-3ß-ol-DH) verwendet. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle im Verlaufe der Steroid-Synthese, wie aus Schema 1 hervorgeht:



Schema 1. Die Reaktionen 1-4 werden von der St-3ß-ol-DH katalysiert, Reaktionen 5-8 von 17ß-hydroxysteroid-Dehydrogenase, Reaktionen 9 und 10 von 3α-hydroxysteroid-Dehydrogenase und Reaktionen 11 und 12 von 11ß-hydroxysteroid-Dehydrogenase. Reaktionen 1-12 finden in den Leydigzellen statt. Sternchen zeigen Steroide an, die im Testis produziert werden.
(Aus Baillie et al., 1966)

Nach der enzymatischen Reaktion sind die St-3ß-ol-DH-aktiven Areale deutlich geschwärzt, so daß die Größe der so markierten Areale ein Kriterium für die Anzahl der "aktiven", d. h. an der Steroidsynthese beteiligten Leydigzellen innerhalb eines Testis darstellt. Mit geeigneten Meßmethoden ist es möglich, die Ausdehnung der geschwärzten Areale und ihren prozentualen Anteil an der Gesamttestisfläche zu bestimmen. Auf diese Weise können Daten über die relative "aktive" Leydigzellfläche gewonnen werden, die Aussagen über den Zustand des Leydigzellsystems zu verschiedenen Zeitpunkten der Entwicklung oder eine eventuelle saisonal bedingte Regression bzw. Evolution ermöglichen.
Verschiedentlich wurde in der Literatur angegeben, daß das fetale Leydigzellsystem in den ersten Tagen nach der Geburt weitgehend zurückgebildet wird (Niemi und Ikonen, 1963), doch wiesen Goslar et al. (1980) bei der Ratte noch am 5. postnatalen Tag Mitosen des intertubulären Leydigzellsystems nach.

In der vorliegenden Arbeit soll anhand der Reaktion der St-3ß-ol-DH die Ausdehnung der "aktiven" Areale des intertubulären Leydigzellsystems während der Entwicklung der T_1-Prospermatogonien, also zwischen dem 17. Fetaltag und dem 5. postnatalen Tag erfaßt werden.

II. Material und Methodik

I. Versuchstiere:
Die 36 Muttertiere der männlichen Feten und Jungtiere (Wistarratten der Inzuchtlinie Müller/Haan) wurden im Zentralen Tierlabor der Universität Düsseldorf gezogen. Am Nachmittag des Verpaarungstages wurden zwei Männchen zu vier bis sechs etwa gleichschweren Weibchen gesetzt. Am Morgen des folgenden Tages, der gleichzeitig als der erste Trächtigkeitstag gilt, wurden die Männchen wieder in einem separaten Käfig untergebracht.

Um die Gravidität nachzuweisen, wurden die

Muttertiere gewogen, und zwar einen Tag vor dem Verpaarungstermin und anschließend am 15. Fetaltag, sowie kurz vor der Präparation der Feten. Gegenüber den nicht graviden Tieren beobachtet man bei erfolgreich gedeckten, trächtigen Ratten eine signifikante Gewichtszunahme. Einen zusätzlichen Hinweis auf die erfolgte Gravidität erbrachte die kurz vor der Präparation durchgeführte Palpation der Feten durch die Bauchdecke des Muttertieres.

Am zu untersuchenden Trächtigkeitstag wurden die graviden Weibchen durch eine Äther-Inhalationsnarkose getötet. Nach Entnahme der Feten aus dem Uterus des Muttertieres wurden bei den männlichen Tieren beide Gonaden herauspräpariert und aus Gründen der Schneidetechnik in ein Stück Leber des Muttertieres eingebettet. Bei den schon geborenen Tieren war das Vorgehen analog: Auch hier wurden die männlichen Jungtiere mit Äther getötet und anschließend beide Gonaden herauspräpariert und wie vorher behandelt. Bei der Präparation des 17. und 18. Fetaltages erwies es sich als notwendig, die Feten in Kopf-, Thorax- und Abdominalsegment

zu teilen. Hier wurde das ganze Abdominalsegment der Feten in die Leber des Muttertieres eingebettet.

Um eine optimale Lokalisierung und Aktivitätserhaltung der Enzyme zu gewährleisten, wurden die in Leber eingebetteten Gonaden in flüssigem Stickstoff bei rund -190°C eingefroren. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß sowohl Eiskristallbildungen als auch Zell- und Gewebsdestruktionen weitestgehend vermieden werden (Winckler 1970, Passia et al. 1980). Das schockgefrorene Material kann in Kohlensäureschnee bei etwa -80°C kurzzeitig aufbewahrt werden. Anschließend wurde das Untersuchungsmaterial aufgeblockt und im Kryostaten geschnitten. Die etwa 8µm bis 10µm dicken Kryostatschnitte wurden gesammelt und numeriert, um danach unterschiedlich weiterbehandelt zu werden:

II. Fixierung der Schnitte:

Die Testisschnitte wurden in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt, wobei zwei aufeinanderfolgende

Schnitte jeweils in unterschiedliche Gruppen gelangten. Die erste Gruppe wurde fünf Minuten lang bei 4°C in reinem Aceton vorfixiert und anschließend drei Minuten an der Luft getrocknet. Die zweite Gruppe wurde nach dem Schneiden im Kryostaten nicht weiter vorbehandelt. Diese verschiedenen Behandlungsmethoden wurden gewählt, um einen Vergleich zwischen fixierten und unfixierten Kryostatschnitten zu bekommen. Mögliche Nachteile einer Fixierung bestehen:

1. in einem Proteinverlust durch Herauslösen aus dem Gewebe
2. in einer Denaturierung von Eiweiß
3. in einer Strukturveränderung einzelner Zellbestandteile
4. in einer chemischen Veränderung reaktiver Gruppen und dadurch in einem Aktivitätsverlust der Enzyme

(Lojda et al., 1979, Passia et al., 1980).
Die nicht mit Aceton vorfixierten Präparate kamen im Anschluß an die Inkubation drei Minuten lang in eine Formol-Calcium-Lösung mit folgender Zusammensetzung:
100 ml säurefreies Formol, 40%

100 ml 10%ige wässrige Lösung von $CaCl_2$

800 ml aqua destillata.

III. Enzymhistochemische Reaktion

(3ß-Hydroxysteroid: NAD^+-Oxidoreduktasen)

E. C. 1.1.1.51

Beide Kryostatschnitt-Gruppen wurden nach einer von Levy et al. (1959) angegebenen und modifizierten Methode inkubiert. Die Inkubationslösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

Substrat: Dehydroepiandrosteron 14,4 mg/5 ml Dimethylformamid.

H^+-Donator: NAD 20,0 mg/10,0 ml H_2O.

Akzeptor: TNBT (Tetranitrotetrazoliumblau) 1 mg/1 ml H_2O.

KCN-Lösung 0,1 M.

Puffer: Phosphatpuffer pH 7,5; 0,1 M.

pH: 7,2 - 7,3.

Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten bei 37°C.

Benutzt man TNBT als Akzeptor, so fällt dieser Farbstoff an der Grenze zwischen Wasser- und Lipidphase meist grobkristallin aus (Lojda et al., 1979). Durch die Aceton-Vorfixierung

wird die Lipidphase aus dem Schnitt herausgezogen, und es bilden sich keine grobscholligen Formazangranula; der Farbstoff ist wesentlich gleichmäßiger verteilt (vgl. auch Passia et al., 1980). Einige Präparate jeder Serie wurden zur Kontrolle mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt.

IV. Morphometrische Auswertung:
Für die vorliegende Arbeit wurden die Fläche des gesamten Testisschnittes und die Flächen der durch die Enzymreaktion geschwärzten Leydigzellareale bestimmt.
Die Auswertung erfolgte mit dem ASM-Gerät der Firma Leitz. Das Gerät enthält ein Zeichenpult, auf dem das Bild durch Benutzung einer Zeicheneinrichtung am Mikroskop dargestellt wird. Mit einem speziellen Zeichenstift werden die Konturen der zu untersuchenden Bildfiguren nachgezogen. Dabei wird die jeweilige Position des Zeichenstiftes in digitale Koordinatenwerte umgesetzt. Ein nachgeschalteter Mikroprozessor verarbeitet die Koordinatenfolgen entsprechend einem Auswertungsprogramm weiter. Die errechneten

Meßwerte werden von einer Anzeige- oder Datenausgabeeinheit in Ziffern übertragen bzw. auf Wunsch ausgedruckt.
Zunächst wurden die Gesamtflächen der Testes bei zehnfacher mikroskopischer Vergrößerung mit dem Auswertstift, sodann, bei fünfzigfacher mikroskopischer Vergrößerung, jede einzelne geschwärzte Leydigzellfläche umfahren. Die Flächengrößen der so markierten Strukturen wurden ausgedruckt, so daß es möglich war, die Meßwerte aller geschwärzten Leydigzellareale eines Präparates in Relation zur Gesamtfläche dieses Schnittes zu setzen.
Bei diesem Meßverfahren ließen sich die einzelnen "positiv" reagierenden Leydigzellareale außerdem in verschiedene Größenklassen einteilen. Die Ergebnisse der Flächenmessungen wurden nach statistischer Auswertung und bezogen auf den Beobachtungszeitraum vom 17. Fetaltag bis zum 5. postnatalen Tag tabellarisch und graphisch aufgetragen.

III. Ergebnisse

Die Resultate der vorliegenden Auswertungen bezüglich des intertubulären Leydigzellsystems sind in folgenden Tabellen und graphischen Darstellungen zusammengefaßt:

Fetal- bzw Lebens-tag	Prozent der "aktiven" LZ (Aceton-fix.)	Prozent der "aktiven" LZ (unfixiert)	Prozent der "aktiven" LZ (gesamt)
17	15,0 ± 3,0	15,7 ± 2,9	15,4 ± 2,8
18	18,1 ± 1,3	18,2 ± 2,4	18,1 ± 1,9
19	18,9 ± 2,5	19,0 ± 2,7	19,0 ± 2,5
20	13,3 ± 2,6	13,1 ± 2,3	13,2 ± 2,3
21	11,8 ± 2,4	12,4 ± 1,3	12,0 ± 2,0
22	8,8 ± 1,0	8,9 ± 2,3	8,9 ± 1,7
23 (Geburt)	6,9 ± 1,7	6,6 ± 0,6	6,7 ± 0,9
1	4,5 ± 0,7	4,8 ± 0,8	4,6 ± 0,7
2	2,7 ± 1,1	2,9 ± 1,0	2,8 ± 1,0
3	2,4 ± 0,7	2,2 ± 0,6	2,3 ± 0,6
4	1,4 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,4 ± 0,3
5	1,4 ± 0,2	1,4 ± 0,3	1,4 ± 0,2

Tabelle I

Spalte 1 gibt den Fetal- bzw. postnatalen Tag an, an dem die Präparation des Auswertungsmaterials erfolgte. in den Spalten 2 und 3 wird der prozentuale Anteil der St-3ß-ol-DH-positiven Leydigzellareale an der Gesamtfläche der ausgewerteten Schnitte angegeben: Spalte 2 bezieht sich auf die Daten der mit Aceton vorfixierten Präparate, Spalte 3 auf die Meßwerte der unfixierten Testisschnitte. Spalte 4 enthält die Gesamtauswertung aller Schnitte der beiden Gruppen (siehe Fig. 3). Die Angaben hinter den Prozentzahlen betreffen den Vertrauensbereich.

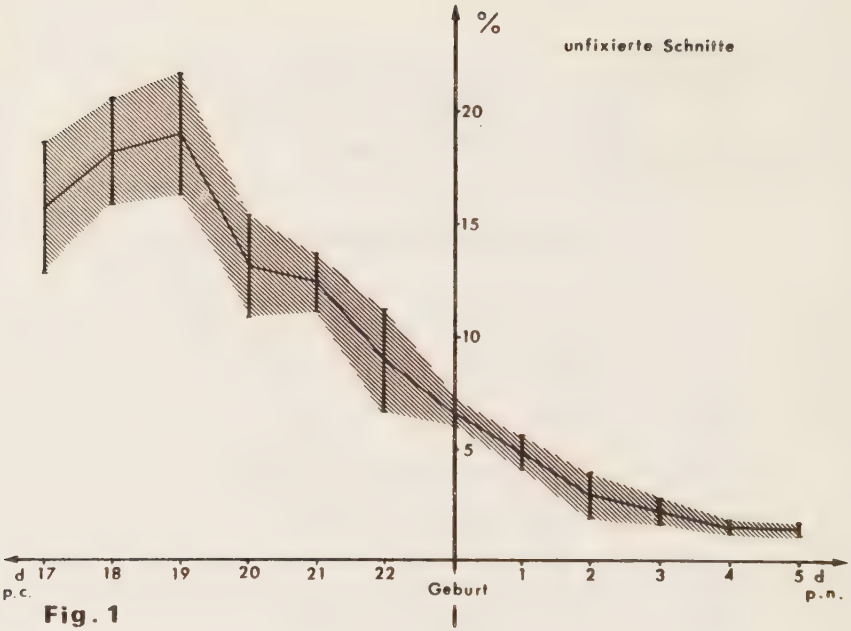

%
unfixierte Schnitte
20
15
10
5
d p.c.
17
18
19
20
21
22
Geburt
1
2
3
4
5
d p.n.

Fig. 1

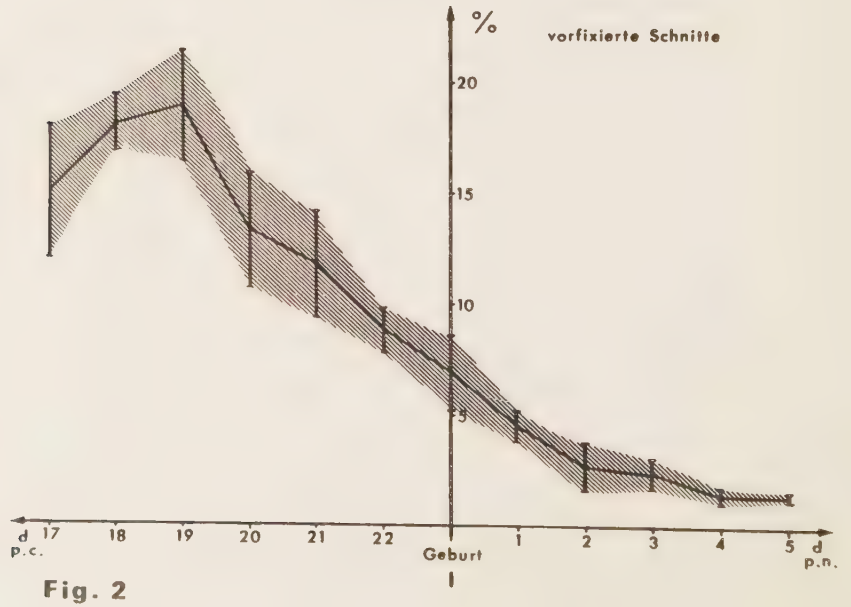

%
vorfixierte Schnitte
20
15
10
5
d p.c.
17
18
19
20
21
22
Geburt
1
2
3
4
5
d p.n.

Fig. 2

Fig. 1 und Fig. 2

Die Kurve in Fig. 1 gibt den zeitlichen Verlauf des prozentualen Anteils der geschwärzten Leydigzellareale in der gesamten Testisfläche der unfixierten Präparate wieder, Fig. 2 das gleiche nach Aceton-Vorfixierung. Der Kurvenverlauf deckt sich nahezu vollständig mit dem der graphischen Darstellung in Fig. 1. Am Auswertungsergebnis ändert somit die Vorfixierung nichts. Die Größe der Vertrauensbereiche der Auswertungsergebnisse ist jeweils durch schraffierte Areale wiedergegeben.
Die Auswertungen der fixierten und der unfixierten Testisschnitte wurden zusammengefaßt und in einer Kurve dargestellt (siehe Fig. 3).

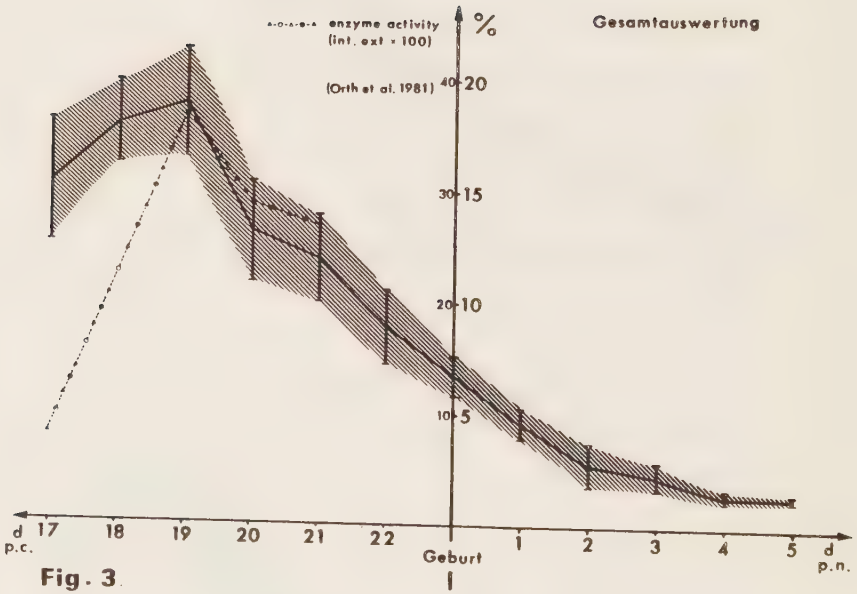

enzyme activity
(int. ext. × 100)
(Orth et al. 1981)
%
Gesamtauswertung
40
30
20
20
15
10
10
5
d p.c.
17
18
19
20
21
22
Geburt
1
2
3
4
5
d p.n.

Fig. 3

Fig. 3

Die Kurve in Fig. 3 läßt erkennen, daß der Anteil des intertubulären Leydigzellsystems an der Gesamtfläche des Testis am 17. Fetaltag 15,4 % und am 19. Fetaltag 19,0 % beträgt. Von da ab fällt der Prozentanteil nahezu kontinuierlich, ohne daß die aktiven Leydigzellkomplexe des intertubulären Systems verschwinden. Wegen der zeitlichen Korrelation zwischen der Ausdehnung der Leydigzellareale im Verhältnis zum gesamten Testis und der Enzymaktivität der St-3ß-ol-DH wurde eine Aktivitätskurve aus der Veröffentlichung von Orth et al. (1981) mit in Fig. 3 übernommen.

4

5

Fig. 4

Diese Abbildung zeigt bei 420facher Vergrößerung eine typische Flächenverteilung der Leydigzellareale am 18. Fetaltag. Es herrschen große, zusammenhängende Komplexe vor, die man anhand der Schwärzung deutlich erkennt.

Fig. 5

Zum Vergleich gibt dieses Foto, das ebenfalls bei 420facher Vergrößerung aufgenommen wurde, die Verhältnisse am dritten postnatalen Tag wieder. Es weist zum vorherigen Foto zwei wesentliche Unterschiede auf:

1) Die enzymaktiven Leydigzellareale nehmen eine wesentlich geringere Fläche im Verhältnis zur Gesamtfläche des Präparates ein.
2) Die geschwärzten Areale sind im Durchschnitt wesentlich kleiner als auf dem vorherigen Foto.

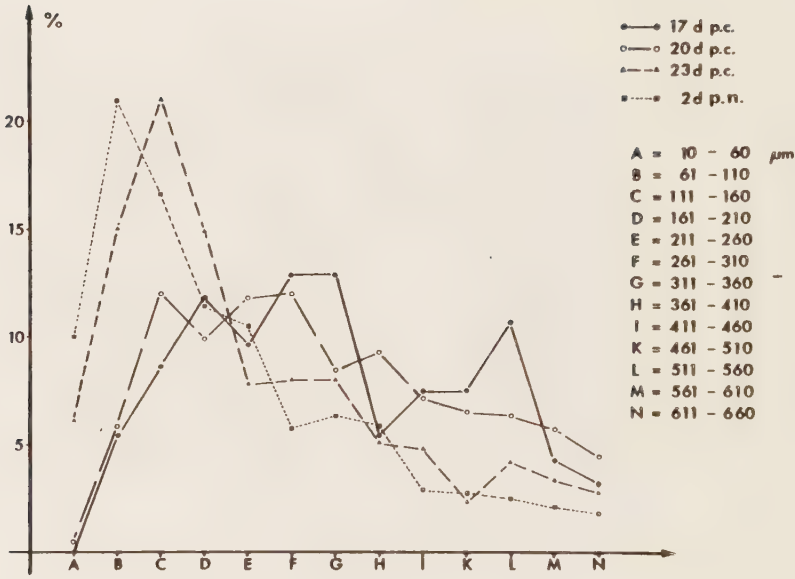


Fig. 6

Um eine eventuelle Aufgliederung der Leydigzellkomplexe während des untersuchten Entwicklungsabschnittes zu erfassen, wurden verschiedene Größenklassen der Leydigzellareale gebildet. Auf der Abszisse der graphischen Darstellung sind die Größenklassen A bis N aufgetragen, die sich jeweils um einen Flächeninhalt von 50 μm^2 voneinander unterscheiden. Die Ordinate

gibt den Prozentsatz der Häufigkeit dieser Leydigzellgruppen - bezogen auf die Gesamthäufigkeit der aufgelisteten Gruppen innerhalb der einzelnen Testisschnitte - an. Von den zwölf vorliegenden Verteilungskurven dieser Prozentanteile wurden vier ausgewählt, die von den Fetaltagen 17, 20 und 23 sowie vom zweiten postnatalen Tag stammen.
Das erste Maximum der Kurve 1 (17. Fetaltag) liegt im Bereich der Gruppen F und G (261 μm^2 bis 360 μm^2), ein zweites und drittes Maximum im Bereich der Gruppe D (161 μm^2 bis 210 μm^2) und der Gruppe L (511 μm^2 bis 560 μm^2).
Das erste Maximum der Kurve 2 (20. Fetaltag) befindet sich im Bereich der Gruppe C (111 μm^2 bis 160 μm^2), ein zweites Maximum im Bereich der Gruppen E und F, wobei die relative Häufigkeit der Gruppe F aber nicht so groß ist wie am 17. Fetaltag.
Ein deutliches Maximum der Kurve 3 (23. Fetaltag) liegt im Bereich der Gruppe C; danach fällt die Kurve nahezu kontinuierlich ab und gibt so den weiteren relativen Rückgang großer Leydigzellareale wieder.
Das deutlich erkennbare Maximum der Kurve 4

(2. postnataler Tag) liegt im Bereich der zweitkleinsten Gruppe B (61 μm^2 bis 110 μm^2). Die Abnahme der Häufigkeit großer Leydigzellareale ist hier noch augenfälliger als bei Kurve 3.
Weiterhin ist aus Fig. 4 zu entnehmen, daß bei dem relativen Häufigkeitsanteil der Gruppe A, die die flächenmäßig kleinsten Leydigzellareale umfaßt, ein Anstieg von 0 % am 17. Fetaltag auf 10 % am zweiten Lebenstag zu verzeichnen ist.

IV. Diskussion

Faßt man die Ergebnisse über die perinatale Entwicklung der Leydigzellen zusammen (Literatur siehe Einleitung), so ergibt sich eindeutig, daß die Entwicklung des Leydigzellsystems im Testis der Ratte in zwei verschiedenen Phasen bzw. in zwei morphologisch unterscheidbaren Populationen verläuft:

1) Die intertubulären Leydigzellen (auch als fetale Population bezeichnet) erscheinen

morphologisch nachweisbar am 15. Fetaltag. Enzymhistochemisch werden sie am 17. Fetaltag mit Hilfe des Enzyms St-3ß-ol-DH erstmalig nachweisbar. Am 19. Fetaltag erreichen die "aktiven" Leydigzellkomplexe im Verhältnis zum Gesamtvolumen des Testis ein Maximum. Lokalisiert sind die intertubulären Leydigzellkomplexe in den interstitiellen Dreiecken zwischen mehreren Tubuli seminiferi.

2) Die peritubulären Leydigzellen (auch als adulte Population bezeichnet) entwickeln sich zwischen dem 12. und dem 20. postnatalen Tag. Ein positiver Nachweis der St-3ß-ol-DH ist frühestens am 16. postnatalen Tag möglich. Die peritubulären Leydigzellkomplexe unterscheiden sich in der Lokalisation dahingehend vom intertubulären System, daß die einzelnen Zellgruppen die Tubuli jeweils umgeben, die interstitiellen Dreiecke jedoch aussparen.

Es gilt als erwiesen, daß die Leydigzellen Androgene, besonders Testosteron, synthetisieren (Turner und Bagnara 1972). Darüber hinaus

ergab eine Vielzahl von Untersuchungen Hinweise auf die entscheidende Bedeutung des Testosterons für die somatische und die psychische Geschlechtsdifferenzierung (Neumann 1977).

Die vorliegende Arbeit beschreibt morphometrisch die Entwicklung des fetalen, intertubulären Leydigzellsystems der Ratte mit Hilfe des Enzyms St-3ß-ol-DH. Die erste nachweisbare Aktivität dieses Enzyms tritt am 17. Fetaltag auf. Zu diesem Zeitpunkt entstehen durch Teilung der M-Prospermatogonien die T_1-Prospermatogonien, die eine Lebensdauer von etwa zehn Tagen besitzen (Hilscher und Hilscher 1976). Vorläufer der T_1-Prospermatogonien sind die M-Prospermatogonien, die um den 14. Fetaltag aus den primordialen Geschlechtszellen hervorgehen und wie die Spermatogonien des adulten Tieres ein Proliferationssystem darstellen. Die T_1-Prospermatogonien durchlaufen um den 5. Tag post natum die Mitose und leiten damit einen neuen Proliferationsschub ein, der schließlich zum Aufbau des endgültigen Samenepithels führt. Der Beobachtungszeitraum der vorliegenden Arbeit (17. Fetaltag bis

5. Lebenstag) läuft somit parallel zu der Existenz der T_1-Prospermatogonien.

Die Arbeit von Roosen-Runge und Anderson (1956) über die Entwicklung der Leydigzellen im Testis der Albinoratte beschreibt anhand von Größenmessungen das Volumenverhältnis der Zwischenzellen zu dem Gesamtvolumen des Testis (d.h. das "relative Volumen"). Der Beobachtungszeitraum reicht vom 15. Fetaltag bis zu einem Zeitpunkt zwei Monate nach der Geburt. In dieser Arbeit werden zwei Phasen des Wachstums und der Differentiation sowie eine Phase des Rückganges und der Entdifferenzierung beschrieben. Das Maximum des relativen Volumens (d. h. Anteil der aktiven Leydigzellkomplexe am gesamten Testisvolumen) ist nach Roosen-Runge und Anderson am 19. Fetaltag erreicht. Von da ab verzeichnen die beiden Autoren eine stetige Abnahme des relativen Leydigzellvolumens bis zum 4. postnatalen Tag, woran sich wieder ein leichter Anstieg bis zum 6. postnatalen Tag anschließt.
Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse bestätigen, daß das Maximum der aktiven

Leydigzellareale im Verhältnis zum Gesamtvolumen des untersuchten Testis am 19. Fetaltag zu finden ist. Die stetige Abnahme des relativen Leydigzellvolumens stimmt ebenfalls mit den Angaben von Roosen-Runge und Anderson (1956) überein.

In einer Veröffentlichung von Niemi und Ikonen (1963) über die Histochemie der Leydigzellen des postnatalen, präpuberalen Testis der Ratte - untersucht wurden vier verschiedene Enzymsysteme (unspezifische Esterase, DPNH-dehydrogenase, ß-Hydroxybutyrat-dehydrogenase und Steroid-3ß-ol-dehydrogenase) - wird die Entwicklung des Leydigzellsystems nach der Geburt beschrieben. Die enzymhistochemisch positiv reagierenden Leydigzellareale verringerten sich im Verhältnis zur Gesamtfläche des Testis nach der Geburt kontinuierlich bis zum 9. Tag post natum. Niemi und Ikonen unterscheiden zwischen zwei Leydigzellsystemen, von denen das zweite erst zwischen dem 21. und dem 23. postnatalen Tag aktiv wird.

Eine Untersuchung von Lording und de Kretser

(1972) beschäftigt sich enzymhistochemisch und morphologisch mit der fetalen und postnatalen Entwicklung des Leydigzellsystems. Die Autoren unterscheiden zwei Entwicklungsphasen des Leydigzellsystems vom 15. Fetaltag bis zur zweiten Lebenswoche und von der dritten Lebenswoche an. Weiterhin werden in der Veröffentlichung zwei streng getrennte Leydigzellgenerationen unterschieden, die sich auf unterschiedliche Weise entwickeln. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten aber darauf hin, daß sich Teile des peritubulären Leydigzellsystems eventuell aus dem intertubulären System entwickeln könnten, da sich die intertubulären Leydigzellkomplexe im Laufe des Beobachtungszeitraumes in kleinere Areale aufsplittern und auseinanderweichen.

In der Literatur wird vielfach angegeben, daß sich das fetale intertubuläre Leydigzellsystem nach der Geburt zurückbildet (Niemi und Ikonen, 1963). Wie aber die vorliegenden Untersuchungen zeigen, liegt bis zum 5. postnatalen Tag keine Rückbildung dieses Systems vor. Die relative Abnahme der Leydigzellareale ist auf eine verstärkte Proliferation der Keimstränge

zurückzuführen. Aus den Untersuchungen von Roosen-Runge und Anderson (1956) wird ersichtlich, daß das Volumen der Keimstränge im Untersuchungszeitraum steil ansteigt. Die Ergebnisse von Kohl (1975) zeigen eine ständige Proliferation des fetal angelegten Leydigzellsystems im untersuchten Zeitabschnitt, d. h. vom 18. Fetaltag bis zum 5. Postnataltag (vgl. auch Goslar et al., 1980).

In einer Veröffentlichung von Kuopio et al. (1982) werden die Leydigzellen der Ratte nach der Geburt elektronenmikroskopisch und endokrinologisch mit Hilfe eines Radio Immuno Assay untersucht. Der Autor beschreibt zwei Leydigzelltypen: Die fetalen Leydigzellen sind in "cluster" organisiert, während der "adult" Typ konfluierende Areale im gesamten Interstitium bildet. Darüber hinaus unterscheidet er morphologisch drei Untertypen der fetalen Leydigzellpopulation und zwei Untertypen der "adult" Population. Der fetale Typ produziert wesentlich mehr Steroidhormone pro Zelle als der "adult" Typ. Nach der Beschreibung des Autors bleibt die Leydigzellzahl nach der Geburt zunächst relativ konstant, um nach einer Woche exponentiell anzusteigen.

Auch die Veröffentlichung von Kuopio et al. (1982) spricht also gegen eine Rückbildung des fetalen intertubulären Leydigzellsystems der Ratte nach der Geburt und unterstützt damit die vorliegenden Untersuchungen. Darüber hinaus weisen die Daten von Kuopio et al. (1982) auf eine exponentielle Zunahme der Leydigzellen vom 10. postnatalen Tag an hin. Nach Goslar et al. (1980) wird das peritubuläre Leydigzellsystem vom 12. postnatalen Tag an aufgebaut, so daß der Anstieg der Leydigzellzahl vermutlich hauptsächlich auf Proliferation des peritubulären Systems zurückzuführen ist.

Eine Arbeit von Slob et al. (1980) beschäftigt sich u. a. mit dem Plasma-Testosteron-Spiegel von männlichen und weiblichen Ratten vor und kurz nach der Geburt. Die Testosteron-Verlaufskurve im Plasma zeigt für männliche Ratten eine deutliche Abnahme in den ersten Stunden nach der Geburt. Nach der achtzehnten postnatalen Stunde bis zur vierundzwanzigsten Postnatalstunde steigt der Testosteron-Titer im Plasma wiederum an. Für die weiteren frühen Lebenstage gibt diese Studie keine Ergebnisse an.

Mit Hilfe eines Radio-Immuno-Assay (RIA) wurden auch Plasma-Testosteron-Titer bestimmt (Weisz und Ward, 1980). Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich vom 17. Fetaltag bis zum 5. postnatalen Tag. Weisz und Ward beschrieben den höchsten Testosteronspiegel im Plasma männlicher Feten am 18. Fetaltag. Von da ab verzeichneten sie einen Rückgang des Titers bis zum 22. Fetaltag. Ratten, die am 23. Fetaltag geboren wurden, schienen einen höheren Testosteron-Titer zu haben als solche, die bereits am 22. Fetaltag geboren wurden. Die Testosteron-Konzentrationen verminderten sich weiter nach der Geburt. Weisz und Ward schließen aus ihren Ergebnissen, daß der 18. und eventuell der 19. Fetaltag eine kritische Entwicklungsperiode darstellen, wobei hohe Testosteronspiegel im Blut entscheidend für die männliche Sexualdifferenzierung sind, während die Plasmakonzentrationen dieses Hormons in weiblichen Ratten zu diesem kritischen Zeitpunkt signifikant niedriger liegen. Da - wie oben erläutert - die Leydigzellen als Androgen-produzenten anzusehen sind, unterstützen die Untersuchungen von Weisz und Ward über den Plasma-Testosteron-Spiegel die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich des Wendepunktes in der Entwicklung des intertubulären Leydigzellsystems.

Eine Veröffentlichung von Orth et al. (1981) nimmt ebenfalls auf die Arbeit von Weisz und Ward (1980) Bezug. Sie behandelt die Testisfunktion in Rattenfeten von normalen und streßbelasteten Müttern. Neben der Plasma-Testosteron-Konzentration werden in dieser Veröffentlichung die Aktivitäten der Steroid-3ß-ol-Dehydrogenase und der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase als Kriterien für die Funktion der Leydigzellen verwendet. Die Enzymaktivitäten wurden photometrisch ermittelt und mit dem Plasma-Testosteron-Spiegel korreliert. Beide Verlaufskurven der Enzymaktivitäten zeigen am 19. Fetaltag ein deutliches Maximum. Die Aktivitätskurve des Enzyms Steroid-3ß-ol-Dehydrogenase wurde graphisch in Fig. 3 mit übernommen, um einen direkten Vergleich der prozentualen Leydigzellfläche und der von Orth et al. (1981) ermittelten Enzymaktivität zu erlauben. Zwischen der Enzymaktivität und der Leydigzellfläche zeigt sich eine deutliche Korrelation, die wiederum die Bedeutung des 19. Fetaltages für die Entwicklung des Testis und damit für die männliche Sexualdifferenzierung unterstreicht.

Es steht fest, daß die Testosteron-Produktion in den Leydigzellen durch einen negativen Feedback-Mechanismus vom Hypothalamus durch Gonadotropin-releasing-hormone (LHRH) und von der Hypophyse durch Luteinizing-hormone (LH) gesteuert wird. Dieser Mechanismus wird als hypothalamo-hypophysäre Regulation der Leydigzellfunktion beschrieben (Turner und Bagnara, 1971). Nach einer immunhistochemischen Untersuchung von Watanabe und Daikoku (1979) erscheinen LH-bildende Zellen zum ersten Mal am 17. Fetaltag in der Adenohypophyse der Ratte. Am 18. Fetaltag hat sich die Zahl der LH-bildenden Zellen wesentlich erhöht. Diese Befunde passen zeitlich zum Auftreten "aktiver" Leydigzellareale, welches ebenfalls am 17. Fetaltag erstmals stattfindet.
Eine licht- und elektronenmikroskopische Untersuchung über das Erscheinen von immunreaktivem LHRH im Hypothalamus fetaler Ratten zeigt ebenfalls eine interessante zeitliche Korrelation auf (Kawano, Watanabe und Daikoku, 1980). Das erste Auftreten von LHRH-produzierenden Arealen im Hypothalamus wurde licht- und elektronenmikroskopisch zwischen dem Fetaltag 18,5 und 19,5 beobachtet. Dieser Zeitpunkt markiert auch den Wendepunkt in der

Leydigzellentwicklung und in Bezug auf den Plasma-Testosteron-Spiegel. Somit befinden sich die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung über die Entwicklung des fetalen intertubulären Leydigzellsystems der Ratte in voller Übereinstimmung mit den oben genannten Veröffentlichungen.

Nach den obigen Ausführungen ist der 17. Fetaltag durch das Erscheinen "aktiver" Leydigzellen gekennzeichnet, während vom 19. Fetaltag an die "aktiven" Areale im Verhältnis zum Gesamttestis abnehmen. Der 19. Fetaltag ist somit Höhepunkt und gleichzeitig Wendepunkt in der Entwicklung des intertubulären Leydigzellsystems. Bis zum 4. postnatalen Tag läßt sich ein nahezu kontinuierlicher Rückgang der enzymhistochemisch aktiven Leydigzellen im Verhältnis zur Gesamtfläche des Testisschnittes verzeichnen, ohne daß sich das fetale Leydigzellsystem zurückbildet oder ganz verschwindet. Zwischen dem 4. und dem 5. postnatalen Tag konnte kein Unterschied in der relativen Leydigzellfläche festgestellt werden.
Weiterhin ist zu bemerken, daß die Auswertungen der fixierten und der unfixierten Kryostatschnitte keine wesentlichen Unterschiede aufweisen. Das

deutet darauf hin, daß der eingangs angesprochene Aktivitätsverlust, der durch eine Fixierung verursacht werden kann (vgl. Material und Methodik), im vorliegenden Falle nicht zu einer Veränderung der Auswertungsergebnisse geführt hat.
Vom 17. Fetaltag an - also praktisch sofort nach Einsetzen der Enzymaktivität - nimmt die Größe der Einzelareale der aktiven Leydigzellen ab. Diese Tatsache ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf ein Auseinanderweichen der Leydigzellen im Laufe der Entwicklung zurückzuführen. Das Verteilungsmuster der Leydigzellareale innerhalb des Testis ändert sich so, daß statt weniger großer Areale viele kleine Leydigzellareale entstehen.
Schon am 5. postnatalen Tag, also am Ende des Beobachtungszeitraumes der vorliegenden Arbeit, wurden im peritubulären Interstitium zahlreiche Metaphasen nachgewiesen (Goslar et al., 1980), die man aufgrund der Entfaltung des Zytoplasmas als Leydigzell-Metaphasen ansehen muß. Das bedeutet, daß der Aufbau des peritubulären Systems schon zu diesem frühen Zeitpunkt in Gang kommt. Die St-3ß-ol-DH-positive Reaktion der peritubulären Leydigzellen beginnt jedoch erst mit dem 16. post-

natalen Tag (Goslar et al., 1980). Als Matrix für die Herkunft des peritubulären Leydigzellsystems kommen verschiedene Gewebe in Frage:

1. Undifferenzierte Fibroblasten, die während der stärksten Aktivität des intertubulären Systems noch keinen Leydigzell-Charakter haben.
2. Die primitiven Wandzellen, aus denen das spätere "boundary tissue" hervorgeht.
3. Das intertubuläre Leydigzellsystem.

Neuere Untersuchungen (Goslar et al., 1980) sprechen für die letzten beiden Möglichkeiten.
Schließlich soll darauf hingewiesen werden, daß zum gleichen Zeitpunkt, an dem das peritubuläre System mit Hilfe der Steroid-3ß-ol-Dehydrogenase nachweisbar wird, das Sertolizell-System der Ratte seine Proliferation einstellt. Gleichzeitig reift auch das "boundary tissue" aus, wie anhand der ATPase-Reaktion nachgewiesen werden Konnte (Hilscher et al., 1978).

V. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Steroid-3ß-ol-Dehydrogenase (St-3ß-ol-DH) - einem Marker-Enzym für die Steroid-Biosynthese -

quantititive Aussagen über die Größe der "aktiven" Leydigzellareale des intertubulären Systems bei der Wistarratte zu treffen und die Kinetik dieser Areale zwischen dem 17. Fetaltag und dem 5. postnatalen Tag zu beschreiben.

Das Untersuchungsmaterial bestand aus den Gonaden männlicher Rattenfeten vom 17. Fetaltag bis zur Geburt und von Jungtieren des 1. bis 5. postnatalen Tages. Nach der Präparation wurden die zu untersuchenden Testes in flüssigem Stickstoff eingefroren, und 8µm bis 10µm dicke Kryostatschnitte enzymhistochemisch aufgearbeitet. Die enzymhistochemische Reaktion auf St-3ß-ol-DH wurde mit Dehydroepiandrosteron als Substrat und TNBT als Akzeptor nach einer modifizierten Methode von Levy et al. (1959) durchgeführt. Die morphometrische Messung erfolgte mit Hilfe des ASM-Gerätes der Firma Leitz.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lauten zusammengefaßt:

1) St-3ß-ol-DH-aktive Areale des intertubulären Leydigzellsystems treten erstmals am 17. Fetaltag auf.
2) Am 19. Fetaltag erreichen die Leydigzellkomplexe im Verhältnis zum Gesamttestis räumlich ein Maximum.

3) Nach dem Wendepunkt des 19. Fetaltages geht der Prozentsatz des Leydigzellsystems am Gesamttestis kontinuierlich zurück bis zum 4. Postnataltag.

4) Das intertubuläre Leydigzellsystem ist während des Beobachtungszeitraumes aktiv und bildet sich nicht nach der Geburt zurück.

5) Die Größenverteilung der Leydigzellareale ändert sich während des Beobachtungszeitraumes: die großen Komplexe weichen im Laufe der Entwicklung auseinander und bilden viele kleinere Leydigzellareale.

VI. Literatur

BAILLIE, A. H., FERGUSON, M. M. and HART, D.: Development in steroid histochemistry. Academic Press, New York (1966).

GOSLAR, H. G., B. HILSCHER, W. HILSCHER und D. PASSIA: Enzymhistochemische Untersuchungen am peritubulären Leydigzellsystem der Ratte. Verh. Anat. Ges. 74, 471-472 (1980).

GOSLAR, H. G., D. PASSIA, W. HILSCHER und B. HILSCH Enzymhistochemische Untersuchungen zur Kinetik des inter- und peritubulären Leydigzell-Systems der Ratte. Acta histochemica, Suppl.-Band XXI, 243-246 (1980).

HILSCHER, W. and B. HILSCHER: Kinetics of the male gametogenesis. Andrologia, 8, 105-116 (1976

HILSCHER, B. and W. HILSCHER: Kinetics of Gametogenesis II. Comparative autoradiographic studies of oogonia and multiplying prospermatogo of the Wistar rat. Cell. Tiss. Res. 190, 61 (1978).

HILSCHER, W.: Beiträge zur Spermatogenese des Menschen. Arbeitstagung "Prophylaktische Andrologie im Kindesalter" am 26. 8. 1978 in Remscheid. Vortrag.

KAWANO, H., Y. G. WATANABE, S. DAIKOKU: Light and electron microscopic observation of immunoreactive LHRH in perinatal rat hypothalamus. Cell Tissue Res. 213, 465-474 (1980).

KOHL, H.: Quantitative Untersuchungen zur Kinetik der Leydigzellen während der Evolution der Androcyten. Dissertation, Med. Fak. der Universität Düsseldorf (1975).

KUOPIO, T., J. TAPANAINEN, I. HUHTANIEMI und L. J. PELLINIEMI: Morphological and steroidgenetic characteristics of fetal and adult type Leydig cells in rat testis. Advance Miniposters TESTIS, D7, Rotterdam (1982).

LEVY, H., H. DEANE WENDLER und B. L. RUBIN: Observations on steroid-3ß-ol-dehydrogenase activity in steroid-producing glands. J. Histochem. Cytochem. 7, 320 (1959).

LOJDA, Z., GOSSRAU, R. und SCHIEBLER, T. H.: Enzyme Histochemistry. A Laboratory Manual. Berlin, Heidelberg, New York, Springer (1979).

LORDING, D. W., D. M. DE KRETSER: Comparative ultrastructural and biochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. J. Reprod. Fert. 29, 261-269 (1972).

NEUMANN, F.: Hormonale Regulation der Sexualdifferenzierung bei Säugetieren. Vorlesungsreihe Schering, Heft 3 (1977).

NIEMI, M., M. IKONEN: Histochemistry of the Leydig cells in the postnatal prepubertal testis of the rat. Endocrinology 72, 443-448 (1963).

ORTH, J., D. BADWAY, J. WEISZ, B. WARD and I. WARD: Testicular function in rat fetuses of normal and stressed mothers: implications for sexual differentiation of the nervous system. In: Development and Function of Reproduction Organs (Ed.: A. G. Biskov and H. Peters), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford-Princeton, 208-215 (1981).

PASSIA, D., H. G. GOSLAR, J. HAHNER, W. HILSCHER und B. HILSCHER: Histochemische Untersuchungen zur Kinetik des fetalen und präpuberalen Leydigzell-Systems der Ratte. Alete, Bericht über die wissenschaftlichen Sitzungen S. 30-31, Gießen (1978).

PASSIA, D., J. HAHNER, B. HILSCHER und W. HILSCHER: Enzymhistochemische Untersuchungen an dem inter- und peritubulären Leydig-Zellsystem der Ratte. Verh. Anat. Ges., 73. Versamml. in Regensburg, 699-700 (1978).

PASSIA, D., S. G. HAIDER: Die Bedeutung der Gewebevorbehandlung (Gefriertrocknung und Fixation) zur Darstellung der Enzyme. Der Präparator 29, 299-306 (1980).

QUANTE, W., D. PASSIA, W. HILSCHER: Die Bestimmung der Steroid-3ß-ol-Dehydrogenase im Leydigzellsystem der Ratte durch den Digiscan-Phasen-Integrator. Veterinär-Humanmedizinische Tagung in Gießen 1978 (Vortrag).

ROOSEN-RUNGE, E. C., D. ANDERSON: The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. Acta anat. 37, 125-137 (1980).

SLOB, A. K., M. P. OOMS, J. T. M. VREEBURG: Prenatal and early postnatal sex differences in plasma and gonadal testosterone and plasma luteinizing hormone in female and male rats. J. Endocr. 87, 81-87 (1980).

TURNER, C. D., I. T. BAGNARA: Germ Endocrinology. Verlag W. B. Saunders Co. London (5. Aufl.).

VAN STRAATEN, H. W. M. and C. J. G. WENSING: Leydig cell development in testis of the pig. Biol. Reprod. 18, 86-93 (1978).

WATANABE, Y. G., S. DAIKOKU: An immunohistochemical study on the cytogenesis of adenohypophysial cells in rat testis. Developm. Biology 68, 557-567 (1979).

WEISZ, J., I. L. WARD: Plasma testosterone and progesterone titers of pregnant rats, their male and female fetuses, and neonatal offspring. Endocrinology 106, 306-316 (1980).

WINCKLER, J.: Verwendung gefriergetrockneter Kryostatschnitte für histologische und histochemische Untersuchungen. Histochemie 24, 168-186 (1970 b).

VII. Mein Lebenslauf

Ich, Hans-Georg Ziegler, wurde als Sohn des Lehrers Georg Ziegler und seiner Ehefrau Waltraud, geb. Hammes, wohnhaft in Remscheid-Lüttringhausen, am 27. 11. 1957 in Remscheid geboren. Von 1964 bis 1967 besuchte ich die Gemeinschaftsschule Leverkuser Straße in Remscheid-Lennep. Im gleichen Jahr wurde ich Schüler des Röntgen-Gymnasiums Remscheid-Lennep, wo ich am 4. Juni 1976 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1976/77 immatrikulierte ich mich für das Studium der Zahnmedizin an der Universität Düsseldorf. Dort absolvierte ich am 20. Juli 1977 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 9. Oktober 1979 die zahnärztliche Vorprüfung. Das Staatsexamen der Zahnheilkunde legte ich am 14. Mai 1982 ab. Am 27. Mai des selben Jahres erhielt ich die Bestallung als Zahnarzt.

Vom 1. Juli 1982 bis zum 31. Januar 1983 arbeitete ich als Assistenzzahnarzt in der Abteilung für Zahnerhaltungskunde und Präventive Zahnheilkunde an der Universität Düsseldorf. Seit dem 1. Februar 1983 bin ich als Assistenzzahnarzt in einer freien Praxis beschäftigt.

Remscheid, im November 1983

Hans-Georg Ziegler

VIII. Danksagungen

Herrn Professor Dr. med. W. Hilscher danke ich für die Überlassung des Themas sowie die wertvollen Anregungen.
Herrn Professor Dr. med. H. G. Goslar danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes.
Herrn Akad. Oberrat Dr. Passia danke ich für die wertvollen Hinweise, den enzymhistochemischen Teil betreffend.
Herrn Dr. S. G. Haider danke ich für die zahlreichen Anregungen und Hinweise bei der Fertigstellung der Arbeit.
Frau Grover und Frau Hahner danke ich für ihre Hilfe bei der Präparation der Versuchstiere bzw. während des enzymhistochemischen Teiles.